

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLIGENTIELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTE

NO 9606880A1

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C08H 1/06, C09H 7/00, A61L 15/00, 27/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/06880 (43) Date de publication internationale: 7 mars 1996 (07.03.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01117 (22) Date de dépôt international: 24 août 1995 (24.08.95)		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 94/10539 29 août 1994 (29.08.94) PR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33, avenue du Docteur Georges-Lévy, Parc Club du Moulin à Vent, F-69693 Venissieux Cedex (FR).			
(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (<i>US seulement</i>): BRYSON, Nathan [US/FR]; 2 bis, chemin des Charmes, F-69520 Grigny (FR).			
(74) Mandataire: ROPITAL-BONVARLET, Claude; Cabinet Beau de Loménie, 51, avenue Jean-Jaurès, Boîte postale 7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).			
(54) Title: BIOPOLYMER MODIFIED BY THE INSERTION OF SULPHUR GROUPINGS, METHOD OF OBTAINING SUCH A BIOPOLYMER AND APPLICATIONS IN THE MANUFACTURE OF BIOMATERIALS			
(54) Titre: BIOPOLYMORE MODIFIÉ PAR INTRODUCTION DE GROUPEMENTS SOUFRES, PROCÉDÉ D'OBTENTION ET APPLICATIONS À LA FABRICATION DE BIOMATERIAUX			
(57) Abstract			
Novel biopolymer derivatives in the form of precursors of crosslinkable products, crosslinkable products or at least partially crosslinked products. The invention concerns, in particular, a biopolymer, and especially collagen, modified with grafts of cystein residues or derivatives thereof (cysteic residues) bound to reactional functions, that are carried by said biopolymer and each comprising at least one sulphurous grouping and at least one nitrogenous grouping, both protected by the one and only protective grouping. The invention also relates to a method of obtaining such a biopolymer. The biopolymer can be used, in particular, in the preparation of biomaterials for obtaining medical and especially surgical or cosmetic articles including prostheses, implants and the like.			
(57) Abrégé			
La présente invention concerne de nouveaux dérivés de biopolymères: sous forme de précurseurs de produits réticulables, sous forme de produits réticulables ou sous forme de produits au moins partiellement réticulés. Plus précisément, l'invention a pour objet un biopolymère, en particulier collagène, modifié à l'aide de greffons constitués par des résidus de cystéine ou de ses dérivés ("résidus cystéiques") liés à des fonctions réactionnelles dont est porteur ledit biopolymère et comprenant chacun au moins un groupement soufré et au moins un groupement azoté, tous deux protégés par un seul et même groupement protecteur. L'invention vise, également, un procédé d'obtention d'un tel biopolymère. Ce biopolymère est susceptible d'être utilisé, notamment, dans la préparation de biomatériaux, à partir desquels des articles applicables, par exemple en médecine, et plus particulièrement en chirurgie ou en cosmétique, peuvent être obtenus (prothèses, implants, etc...).			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NK	Niger
BK	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Sabah
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

BIOPOLYMER MODIFIE PAR INTRODUCTION DE GROUPEMENTS SOUFRES, PROCEDE D'OBTENTION ET APPLICATIONS A LA FABRICATION DE BIOMATERIAUX

5 DOMAINE TECHNIQUE :

La présente invention concerne de nouveaux dérivés de biopolymères :

- sous forme de précurseurs de produits réticulables,
- sous forme de produits réticulables,
- 10 - ou sous forme de produits au moins partiellement réticulés.

De tels dérivés sont susceptibles d'être utilisés, notamment, dans la préparation de biomatériaux, à partir desquels on peut obtenir des articles applicables, par exemple en médecine, et plus particulièrement en chirurgie ou en cosmétique.

Parmi ces articles, on peut citer :

- 15 - les tissus ou les organes artificiels, tels que la peau artificielle, les prothèses ou implants osseux, ligamentaires, cardiovasculaires, intra-oculaires, etc,
- les accessoires médicaux, tels que les fils de sutures ou les revêtements de biocompatibilisation d'articles médicaux implantables,
- ou bien encore les systèmes de bioencapsulation (implants, microsphères, 20 microcapsules), permettant la libération contrôlée de principes actifs.

L'invention concerne, également, l'un des procédés d'obtention de ces nouveaux dérivés de biopolymères.

Les biopolymères doivent être des matériaux biocompatibles et capables de s'assimiler au mieux aux matériaux biologiques, notamment sur le plan mécanique, 25 de manière à pouvoir les remplacer.

Les biopolymères considérés dans le présent exposé sont toutes les macromolécules d'origine naturelle ou synthétique et de nature protéique et/ou glucidique et/ou lipidique.

Sans que cela ne soit limitatif, on s'intéressera ici plus spécifiquement aux 30 dérivés de collagène.

Le collagène est une protéine connue, présente à tous les niveaux de

l'organisation des tissus conjonctifs : il s'agit de la principale protéine de la peau et du tissu conjonctif. Par nature, il possède des caractéristiques biochimiques et physico-chimiques relativement bien adaptées pour des utilisations en tant que biomatériaux.

5 Au sens de la présente invention, il est à noter que le terme "collagène" désigne également tout peptide de nature collagénique, tel que le collagène natif avec ou sans télopeptides, ou toute espèce de collagène plus ou moins dénaturé, gélantine y compris.

10 TECHNIQUE ANTERIEURE :

Pour adapter les biopolymères, en particulier le collagène, à leurs applications, il est très vite apparu nécessaire de les soumettre à des modifications chimiques en vue de leur conférer de nouvelles propriétés chimiques et/ou biochimiques et/ou physiques, dont 15 notamment une meilleure résistance mécanique et une meilleure résistance à la protéolyse.

S'agissant du collagène, on distingue trois types de modifications chimiques ayant en commun la mise en réaction d'une ou plusieurs fonctions libres réactives du collagène avec au moins un composé organique ou minéral :

- autoréticulation du collagène sous l'effet du composé ajouté,
- 20 - réticulation du collagène à l'aide d'un composé disfonctionnel créant des pontages entre les chaînes,
- greffage d'un réactif monofonctionnel ("greffon") sur le collagène, de façon à modifier son comportement chimique et/ou physique.

Il va de soi qu'il existe un plafond de réticulation et/ou de fonctionnalisation du 25 biopolymère, par des greffons réticulants. Ce plafond est dépendant du nombre de sites ou de fonctions réactives présentes sur chaque chaîne de collagène.

Bien que la composition d'acides aminés puisse varier selon l'origine du collagène (peau ou os de porc) et la méthode d'extraction (digestion en milieu acide ou basique) de la protéine, on peut déterminer la composition moyenne en acides aminés 30 fonctionnels suivante (exprimée en nombre d'acides aminés pour cent acides aminés de la protéine) : acide glutamique ≈ 7, acide aspartique ≈ 4, sérine ≈ 2, thréonine ≈ 3, hydroxyproline ≈ 8, arginine ≈ 5, lysine ≈ 3.

Les techniques de réticulation chimique connues en la matière font intervenir des réactifs toxiques (dialdéhydes, glutaraldéhydes, chlorure de diacide et diisocyanates) et/ou génèrent des résidus affectés du même défaut.

Il a été proposé, également, d'exploiter le pontage le plus couramment rencontré sur le plan biologique, la liaison disulfure - S - S -.

L'article intitulé "Einbau von cystin-brücken in kollagen", F. SCHADE & H. ZAHN, Angew. Chem 74, 904 (1962), décrit ainsi la fixation directe d'un dérivé de la cystine sur du collagène, pour tenter d'effectuer une réticulation par pontage S - S - ("thiolation du collagène"). L'agent réticulant mis en oeuvre est un dérivé de la cystine, dans lequel les deux fonctions amines de la cystine ont été bloquées par un groupement protecteur, du genre benzyloxycarbonyle et dans lequel les deux fonctions acides de la cystine ont été activées par estérification à l'aide de nitrophénol. Le greffage de ce dérivé de cystine sur le collagène s'opère dans un milieu neutre à base de diméthylformamide et d'eau. Après greffage sur le collagène, les ponts disulfure ont été réduits, puis réoxydés par l'oxygène de l'air (facteur d'autoréticulation) en milieu basique.

On connaît également, par la demande de brevet EP 0 052 288, ainsi que par la demande de brevet FR 92-07 692 au nom de la Demandante, une modification du collagène consistant à lui greffer, sur ses fonctions réactives de type NH₂ et OH, des greffons formés par un composé d'espacement et un reste cystéique (= cystéine). Dans ces deux demandes de brevet, les composés d'espacement sont, respectivement, un dialdéhyde et un diacide carboxylique.

Il est à souligner que ces deux techniques sont relativement complexes et comprennent un nombre important d'étapes. En particulier, elles imposent de passer par une forme réticulée S - S du collagène, d'où il s'ensuit que les formes réticulables ne peuvent être obtenues qu'après une étape de réduction plus ou moins complexe.

D'autres propositions de l'art antérieur reposent sur l'emploi de composés réactifs du type N-acétylhomocystéinethiolactone (cf. brevet US-A-1 712 193, US-A-3 329 574, US-A-3 111 512, EP-A-0 049 469). La protection de la fonction amine de l'homocystéine par "N-acétylation", mise en oeuvre dans ces propositions techniques, est particulièrement gênante en raison de sa non réversibilité. Aucun des

susdits documents ne donne d'ailleurs de moyens faciles pour l'élimination de ce groupement protecteur.

Dans un autre registre que celui de la modification chimique de biopolymères, et en particulier de collagènes, on connaît la 4-carboxy-L-thiazolidine, susceptible d'être obtenue par condensation d'aldéhyde ou de cétone avec la cystéine et utilisée en synthèse peptidique en tant que substituant d'acides aminés. A cet égard, on se référera aux articles suivants :

- T. W. GREENE, P. G. M. WUTS ; John Wiley & Sons (NEW YORK), 1991, p. 292 : "Protective Groups in Organic Synthesis" (*Voir également références citées dans cet article*).
- ROSAMOND & FERGER - Oxytocyn Analogues - Journal of Medicinal Chemistry, 1976, vol. 19, n° 7, p. 873-876 : "Synthesis and Some Pharmacological Properties of Oxytocin Analogues Having L-Thiazolidine-4-carboxylic Acid in Position 7".

Aucun de ces articles ne suggère la mise en oeuvre de la 4-carboxy-L-thiazolidine en tant que greffon de biopolymères et, en particulier, de collagène, afin de lui apporter une fonctionnalité "thiolée" de réticulation. Qui plus est, ces articles auraient plutôt tendance à détourner l'homme du métier de la démarche consistant à recourir à ces produits à titre de greffons. En effet, ces articles présentent la protection de la fonction amine du cycle thiazolidine comme une étape indispensable et il est clair qu'une telle disposition est contraignante dans une perspective industrielle.

Force est donc de constater que l'art antérieur ne comprend que des propositions non satisfaisantes en matière de modifications chimiques de biopolymères, et en particulier de collagènes, à des fins de préparation de matériaux "préréticulables", réticulables et réticulés par formation de pontages S - S.

Il s'ensuit que la présente invention vise à fournir un biopolymère, et en particulier un collagène, modifié, précurseur de formes réticulables par formation de ponts disulfures en présence d'oxydants doux procurant une excellente maîtrise de la cinétique et du taux de réticulation.

Un autre but de l'invention est de fournir un biopolymère, en particulier un collagène, "thié" i. e réticulable et issu d'une forme stable "préréticulable".

Un autre but de l'invention est de fournir un biopolymère, et en particulier un collagène, modifié se présentant sous forme de réticulat comprenant des pontages S - S.

Un autre but de l'invention est de fournir un procédé de préparation de biopolymères modifiés, en particulier de collagènes, simple à mettre en oeuvre et conduisant à des précurseurs de formes réticulables, lesquels précurseurs étant stables et transformables facilement en produits réticulables, sans qu'il soit nécessaire de passer par des formes réticulées.

10 BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION :

Tous ces buts, parmi d'autres, sont atteints par la présente invention qui concerne, tout d'abord, un biopolymère, en particulier collagène, modifié à l'aide de greffons constitués par des résidus de cystéine ou de ses dérivés ("résidus cystéiques") 15 liés à des fonctions réactives, dont est porteur ledit biopolymère et comprenant chacun au moins un groupement soufré et au moins un groupement azoté, tous deux protégés par un seul et même groupement protecteur.

Les résidus cystéiques sus-mentionnés sont des composés comprenant au moins une fonctionnalité soufrée du type thiol et au moins une fonctionnalité azotée 20 du type amine. Il peut s'agir, par exemple, de restes de cystéine, d'homocystéine, de pénicillamine, etc.

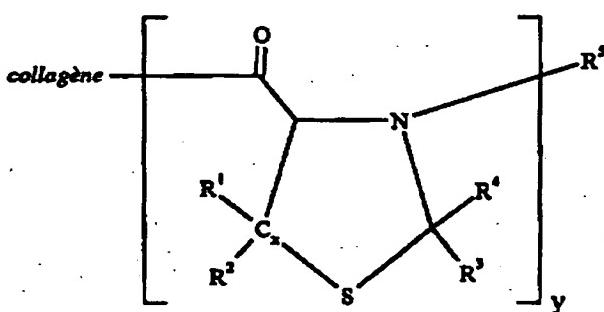
L'une des originalités de l'invention réside dans le fait d'avoir trouvé un groupement protecteur, constitué par une seule et même entité moléculaire, et 25 s'appariant particulièrement bien à la fois aux groupements soufrés et aux groupements azotés du résidu cystéique.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION :

De manière préférée, ce greffon répond à la formule générale suivante :

(I)

5



10 dans laquelle :

- x est un nombre entier et lorsque ce nombre entier est supérieur à 1, R¹ et R² peuvent être identiques ou différents de carbone à carbone,
- y est un nombre entier,
- R¹, R², R³, R⁴ sont semblables ou différents et représentent l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les alkyles linéaires et/ou cycliques et/ou ramifiés, les aryles, les aralkyles, les alcényles, les aralcényles, les alcynes u les aralcynes, tous ces radicaux étant éventuellement substitués, et les alkyles inférieurs en C₁-C₆ étant plus particulièrement préférés,
- R⁵ est l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les radicaux acyles, alkyloxycarbonyles, aryloxycarbonyles ou aralkyloxycarbonyles, l'hydrogène étant plus particulièrement préféré.

15 Ce greffon est directement lié aux biopolymères par l'intermédiaire de sa fonction carboxylique, laquelle est apte à réagir avec les sites réactifs de type NH₂ et OH du biopolymère, lorsqu'il en possède. Et c'est bien le cas en ce qui concerne le collagène.

20 Comme cela ressort de la formule (I), le greffon peut être constitué de y unités récurrentes, ce qui lui donne un caractère de polygreffon, lié à au moins un site de substitution du biopolymère par l'intermédiaire du carbone.

25 Avantageusement, x et y sont égaux à 1 ou 2, de préférence à 1, indépendamment l'un de l'autre.

30 Selon une disposition préférée de l'invention, les substituants R¹, R², R³

et R⁴ du greffon I selon l'invention correspondent à l'hydrogène ou aux radicaux alkyles inférieurs suivants : méthyle, éthyle, propyle, butyle.

De façon encore plus privilégiée, R¹ = R² = H ou CH₃, et R³ = R⁴ = CH₃.

Pour compléter la définition de ce mode préféré de réalisation du greffon 5 selon l'invention, il convient d'indiquer que la forme la plus courante est celle dans laquelle : x = y = 1 avec R¹, R² = H et R³ = R⁴ = CH₃. On est alors en présence d'un reste 4-carbonyle-L-thiazolidine fixé sur les chaînes du biopolymère et, en particulier, du collagène.

Les produits ainsi transformés constituent des précurseurs de ceux se 10 présentant sous forme réticulable. Ces précurseurs présentent l'avantage d'être particulièrement stables à l'air libre et de pouvoir être utilisés directement pour l'obtention de biomatériaux réticulables, dans une première étape, et de biomatériaux réticulés dans une deuxième étape.

La première étape consiste simplement à mettre le biopolymère lié au 15 greffon I dans une solution aqueuse, au sein de laquelle se produit la libération du groupement protecteur masquant les fonctions thiols, lesquelles sont aptes à s'autoréticuler dans une deuxième étape et ce, de manière spontanée ou par mise en œuvre d'une oxydation, de préférence douce.

La présente invention a donc également pour objet :

- 20 - d'une part, le biopolymère, en particulier le collagène, thiolé obtenu à partir du précurseur défini ci-dessus,
- et, d'autre part, le biopolymère, en particulier le collagène, réticulé par formation de ponts disulfures et obtenu directement à partir du produit thiolé et, de fait, indirectement à partir du précurseur.

25 Ces trois types de biopolymères ou collagènes modifiés sont aisément façonnables et manipulables industriellement. Il convient, en outre, de souligner le caractère simple et économique de leur synthèse. De plus, ils permettent d'obtenir des articles médicaux du type implants, prothèses ou peaux artificielles, atoxiques, non immunogènes et dont les propriétés mécaniques et biologiques peuvent être parfaitement adaptées à l'application visée.

30 Dans le mode préféré de mise en œuvre de l'invention, ce substituant R³

correspond à l'hydrogène. Cette caractéristique est particulièrement originale et avantageuse car elle traduit le fait que, conformément à l'invention et de manière surprenante et inattendue, il n'est pas nécessaire de prévoir une protection sur le groupement azoté (amine) du greffon I. Cela supprime toute une série d'opérations et de réactifs plus ou moins faciles à éliminer et susceptibles de polluer le biomatériau. Il va de soi que cet avantage ne saurait être considéré comme une limitation de l'invention. Ainsi, le substituant R⁵ peut être constitué par tout groupement protecteur connu en lui-même et approprié en synthèse peptidique, . g : benzyloxycarbonyle, nitrobenzyloxycarbonyle, butoxycarbonyle ...

Le taux de greffage de ce biopolymère, en particulier de ce collagène, modifié peut varier dans une large plage de valeurs. Ceci est particulièrement intéressant au regard de l'adaptabilité, notamment sur le plan des propriétés mécaniques, du biomatériau dans sa forme réticulée, à diverses applications finales.

Suivant une caractéristique avantageuse de l'invention, le greffon I est fixé sur le biopolymère, dans une concentration inférieure ou égale à environ 3,0 mmol de (I)/g de collagène.

Le collagène est un biopolymère, qui s'inscrit particulièrement bien, mais non limitativement, dans le cadre de l'invention. Il peut s'agir de collagène natif, avec ou sans télopeptides, ou bien encore de collagène sous forme dénaturée (déboînée).

Selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un biopolymère, en particulier de collagène modifié, consistant, essentiellement :

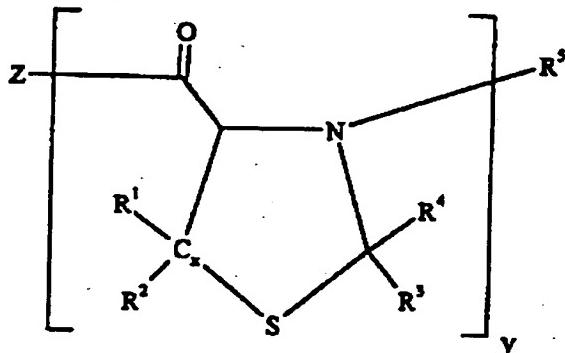
- à mettre le biopolymère de départ en présence d'un solvant, de préférence organique,
- à mettre en oeuvre au moins un greffon constitué par au moins un résidu cystéique comprenant au moins un groupement soufré et au moins un groupement azoté, tous deux protégés par un seul et même groupement protecteur,
- à faire réagir le biopolymère solvaté avec le greffon,
- et à récupérer le biopolymère ainsi modifié.

Selon une caractéristique préférée de ce procédé, le greffon répond à la

formule générale (I') suivante :

5 (I')

10



dans laquelle :

- x est un nombre entier et lorsque ce nombre entier est supérieur à 1, R¹ et R² peuvent être identiques ou différents de carbone à carbone,
- y est un nombre entier,
- R¹, R², R³, R⁴ sont semblables ou différents et représentent l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les alkyles linéaires et/ou cycliques et/ou ramifiés, les aryles, les aralkyles, les alcényles, les aralcényles, les alcynes ou les aralcynes, tous ces radicaux étant éventuellement substitués, et les alkyles inférieurs en C₁-C₆ étant plus particulièrement préférés,
- R⁵ est l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les radicaux acyles, alkyloxycarbonyles, aryloxycarbonyles ou aralkyloxycarbonyles, l'hydrogène étant plus particulièrement préféré,
- Z = H, halogène, OR⁶ avec R⁶ = hydrogène, alkyle, aryle ou aralkyle, imidazole ou autres résidus minéraux ou organiques, aptes à conférer au greffon une réactivité vis-à-vis des fonctions amines et/ou alcools du biopolymère, afin de former des liaisons covalentes de type ester et/ou amide.

30 Le principe de ce procédé consiste donc à faire réagir le greffon I' avec les sites réactifs des chaînes du polymère (NH₂, OH dans le cas du collagène). Les

liaisons ainsi formées sont donc des liaisons esters ou peptidiques qui permettent d'apporter, au travers du composé I', une fonctionnalisation azotée et soufrée, cette dernière conférant aux biopolymères une aptitude à la réticulation.

Avantageusement, R², R³ et R⁴ = CH₃, ou H dans la formule I'. Plus préférentiellement encore, R¹, R² = CH₃, et R³, R⁴ = H.

De même que pour le greffon I' décrit ci-dessus, x et y correspondent, avantageusement, à 1.

R⁵ représente, quant à lui, l'hydrogène ou un groupement protecteur des amines conventionnels, l'hydrogène étant plus couramment retenu.

S'agissant de Z, on sélectionne avantageusement un hydroxyle (forme acide de la molécule) ou des radicaux d'activation classique en synthèse peptidique, comme cela sera décrit infra.

A titre d'exemples de greffons I' on peut citer : le 4-carboxy-2,2-diméthylthiazolidine, le 4-carboxy-thiazolidine ou le 4-carboxy-2,2,5,5-tétraméthylthiazolidine.

Conformément à une modalité préférée de l'invention, le biopolymère de départ est un collagène natif ou un atélocollagène, dénaturé ou non, ou bien encore un mélange d'au moins deux de ces différents collagènes.

Le procédé selon l'invention permet un greffage simple et économique du composé I' sur le biopolymère. A ce propos, on peut d'ailleurs signaler que, dans le cas où le greffon I' est formé de manière préférée de 4-carboxythiazolidine, n'a affaire à un réactif disponible facilement, préparable par condensation de cystéine avec une cétone ou un aldéhyde.

Conformément à une modalité préférée de l'invention, le biopolymère de départ est un collagène natif ou un atélocollagène, dénaturé ou non, ou bien encore un mélange d'au moins deux de ces différents collagènes.

En pratique, le biopolymère collagène de départ est solubilisé ou dispersé dans le milieu solvant, de préférence anhydre. Suivant une disposition avantageuse de l'invention, ce solvant est sélectionné parmi les solvants organiques et, de préférence, parmi la liste non limitative suivante : N,N-diméthylformamide, N,N-diméthylacétamide, N-méthylpyrrolidone, diméthylsulfoxyde, méthanol, éthanol,

propanol ou autre alcool ainsi que les analogues de tous ces solvants et leurs mélanges.

Cette solubilisation (ou dispersion) s'effectue, de préférence, séparément et avant la mise en présence dudit polymère de départ avec le greffon I'.

5 Selon une modalité avantageuse de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, il est prévu d'activer le reste carboxylique du greffon I' avant de le faire réagir avec le biopolymère, en particulier le collagène. Une telle activation est bien connue dans le domaine de la synthèse peptidique. Elle consiste à accoupler la fonction acide avec des composés aptes à favoriser la formation d'un amide entre le
10 COOH du greffon I' et les sites réactifs de type amide primaire du biopolymère. A titre d'exemple de système de couplage approprié, on peut citer :
- le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en présence ou non de N-hydroxysuccinimide ou de N-hydroxybenzotriazole, respectivement HO_{Su} et HO_{Bt},
- le carbonyldiimidazole (CDI) en présence ou non de N,N-diméthylpyridine
15 (DMAP).

La réaction entre le biopolymère solvaté et le greffon I' (système d'activation) s'effectue par mélange de ses composés et maintien du milieu réactionnel sous agitation pendant plusieurs heures. Une fois la modification chimique du biopolymère terminée, on récupère celui-ci par précipitation et/ou élimination du solvant, ladite élimination s'opère, de préférence, par filtration, par séparation selon un gradient de densité (décantation, centrifugation) ou par évaporation de solvant. Pour précipiter le collagène, on mélange avec un additif approprié. L'acétone et l'acétate d'éthyle sont deux exemples de ce type d'additif.
20

Cette méthodologie permet d'obtenir un biopolymère, en particulier un collagène, modifié par réaction avec le greffon I', ce dernier répondant à la formule (I) une fois lié au polymère.

Il s'agit donc d'un précurseur de biopolymère réticulable, i. e thiolé, qui peut être préparé très aisément en mettant ledit précurseur en présence d'un milieu aqueux de déprotection. En pratique, cette déprotection peut consister en une hydrolyse du groupement protecteur, intervenant lors de la mise en oeuvre dudit biomatériau ou lors d'une purification, telle qu'une dialyse. Pour éviter que le
30

biopolymère s'autoréticule lors de la dialyse, on effectue celle-ci en milieu acide, à un pH, de préférence, inférieur ou égal à 4.

Le biopolymère (collagène) ainsi préparé est fonctionnalisé par des groupements SH selon des taux de greffage variables : compris entre 80-90 greffons (I) (résidus cystéiques déprotégés) pour 1 000 acides aminés du collagène, dans le cas où le biopolymère considéré est formé par cette protéine.

Pour poursuivre encore la transformation du biopolymère (collagène), il est possible de le soumettre, dans sa forme thiolée protégée ou non, à une oxydation, de préférence dans des conditions douces, aptes à l'amener à un état au moins partiellement réticulé, par formation de ponts disulfures.

Les conditions d'oxydation douces préconisées conformément à l'invention consistent à recourir à : l'air, l'O₂, des composés iodés (I₃, bétadine ou analogues), de l'H₂O₂, du persulfate de sodium, etc.

Une telle oxydation conduit à un réseau tridimensionnel insoluble dans les milieux physiologiques et soluble dans des milieux réducteurs capables de réduire les ponts disulfures.

Comme cela ressort de ce qui précède, le procédé selon l'invention bénéficie de nombreux avantages.

Tout d'abord, ce procédé permet de traiter de nombreux biopolymères possédant des fonctions réactives OH, NH₂. En particulier du collagène, dans sa forme native, sans engendrer de dénaturation de sa structure triple hélice, ce qui peut être particulièrement intéressant dans certaines applications.

A cet égard, il faut observer que le collagène modifié selon l'invention n'est pas atteint dans son intégrité structurelle et peut être soumis au traitement connu de fibrillogénèse au pH isoélectrique (phosphate pH environ 7,4). Selon ce traitement, on provoque un alignement des triples hélices de collagène grâce à l'interaction des radicaux chargés NH₃⁺ et COO⁻ dont est porteur le collagène à ce pH.

Or, comme indiqué supra, le greffon (I) est fixé au collagène, par formation d'une liaison amide avec les amines, des acides aminés collagéniques. Les amines ainsi neutralisées sont remplacées par les amines N-R³ des greffons (I). Ainsi, dans le cas où R³ = H, le collagène modifié dispose toujours d'une

fonctionnalité amine permettant la fibrillogénèse.

Conformément à l'invention, il est donc possible d'obtenir un alignement et une organisation en fibres alignées, des triples hélices non dénaturées du collagène modifié.

5 La présente invention a donc également pour objet un collagène modifié caractérisé en ce qu'il se présente sous forme de triples hélices non dénaturées et en ce que ces triples hélices sont organisées et alignées en faisceau, de manière à former une structure fibreuse.

10 Pour compléter la liste des avantages du procédé selon l'invention, on indiquera qu'il est de mise en œuvre aisée, rapide et économique.

La préparation des différentes formes de modification, à savoir précurseur, forme thiolée, forme réticulée, s'effectue de manière douce, sans multiplication de réactifs et d'étapes de procédé.

15 Les produits intermédiaires non hydrolysés qu'il permet d'obtenir sont stables à l'air libre.

Le schéma réactionnel qui caractérise ce procédé est énantiosélectif, ce qui permet de garantir la biocompatibilité des matériaux synthétisés.

20 Les conditions réactionnelles et les réactifs utilisés dans le cadre du procédé selon l'invention ne sont pas toxiques, ni agressifs en eux-mêmes vis-à-vis des tissus vivants, pas plus qu'ils ne sont transformables en sous-produits ayant ces caractères. De plus, ces réactifs ne sont pas nombreux et sont facilement éliminables par des procédés non dégradants, comme la dialyse par exemple.

25 L'obtention de biopolymères thiolés selon ce procédé ne passe pas par la formation de biopolymères sous forme réticulée, qui constitue une étape supplémentaire et gênante sur le plan industriel.

Ce procédé selon l'invention offre également la possibilité très appréciable de pouvoir contrôler la cinétique et le taux de réticulation du collagène, ce qui permet, subséquemment, de moduler ses propriétés mécaniques.

Il faut souligner que les produits selon l'invention sont stérilisables par les 30 méthodes classiques de stérilisation de polymères biologiques.

APPLICATION INDUSTRIELLE :

Il s'ensuit que les produits réticulables selon l'invention trouvent des applications immédiates, d'une part, en médecine humaine et, d'autre part, dans le 5 domaine de la biologie.

En médecine humaine, il peut s'agir d'implants, par exemple ophtalmologiques, de prothèses, par exemple osseuses, de pansements sous forme de films ou de feutres, de tissus artificiels (épiderme, vaisseaux, ligaments, os), de systèmes de bioencapsulation (microsphères, microcapsules) permettant la libération 10 contrôlée de principes actifs *in vivo*, de revêtements de biocompatibilisation d'articles médicaux implantables ou bien, encore, de fils de suture.

En biologie, les matériaux suivant l'invention constituent d'excellents supports pour cultures cellulaires bidimensionnelles (films) et tridimensionnelles (feutres).

15 Le collagène réticulé selon l'invention peut être utilisé seul ou en mélange avec des polymères biologiques modifiés ou non ou des polymères synthétiques.

Pour chacune des applications biomédicales précitées, il est indispensable de disposer d'un collagène, réticulé, possédant des propriétés physicochimiques, mécaniques ou biologiques déterminées et spécifiques. Par conséquent, il est nécessaire de maîtriser parfaitement les modifications chimiques du collagène, de manière à pouvoir produire une gamme de collagènes réticulables et répondre ainsi, 20 de façon satisfaisante, aux contraintes apparaissant lors de l'élaboration du cahier des charges d'une application donnée. Comme cela ressort de la description ci-dessus, l'invention répond parfaitement à cette nécessité.

25 D'autres avantages et variantes de la présente invention ressortent bien des exemples de mise en œuvre du procédé suivant l'invention donnés ci-après.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : MODIFICATION DE COLLAGENE TRIPLE HELICE PAR REACTION AVEC LE 4-CARBOXYL-DIMETHYLTHIAZOLIDINE (DMT) [R¹, R² = H, R³, R⁴ = CH₃, DANS LE GREFFON (I)].

5

On effectue le gonflement de 1,5 g d'atélocollagène dans 150 ml de méthanol. Parallèlement à cela, on prépare une solution de DMT (selon la méthode de J. KEMP, "Org. Chem.", 1989, 54, 3640).

10

On met ensuite en oeuvre une étape d'activation par réaction de 1,18 g de DMT-COOH et de 1,17 g de carbonyldiimidazole (CDI) dans 10 ml de N-méthylpyrrolidine (NMP) pendant 60 minutes à température ambiante. Les deux préparations sont ensuite mélangées ensemble pendant 16 heures. La précipitation du collagène est effectuée par l'addition d'un litre d'acétate d'éthyle. Une filtration et un séchage permettent d'obtenir enfin un produit blanc (1,5 g).

15

La teneur du greffon I (résidu cystéique) est déterminée par réaction avec l'acide dithionitrobenzoïque (DTNB), puis dosage spectrophotométrique.

RÉSULTATS :

20

[SH] μmol/mg collagène modifié = 0,224, soit environ 26 résidus cystéiques par chaîne de collagène,

Analyse calorimétrique : température de dénaturation en solution tampon pH 7,4 de 44° C. Ceci est révélateur de la conservation de la triple hélice lors du greffage du DMT.

25

EXEMPLE 2 : DENATURATION ET MODIFICATION DE COLLAGENE PAR REACTION AVEC LE DMT (R¹, R² = H, R³, R⁴ = CH₃).

30

On effectue la dissolution de 1,5 g d'atélocollagène dans un mélange de 20 ml de méthanol (MeOH) et 30 ml de N-méthylpyrrolidinone (NMP). Après évaporation sous vide du méthanol, on obtient une solution transparente de collagène, qui a perdu sa

forme en triple hélice.

Parallèlement, on prépare une solution de DMT activée par réaction de 1,18 DMT-COOH et de 1,17 g de N,N-carbonyldiimidazole (CDI) dans 10 ml de NMP pendant 60 minutes à température ambiante. Les deux solutions sont ensuite mélangées ensemble avec 1 g de N,N-diméthylaminopyridine (DMAP) pendant 16 heures. Après l'ajout de 30 ml d'eau à pH 2, la solution est dialysée contre l'eau à pH 2, puis lyophilisée, afin d'obtenir un produit blanc déprotégé (1,5g).

La teneur en greffon I (résidu cystéique) est déterminée par réaction avec le DTNB, puis dosage spectrophotométrique.

10

RÉSULTATS :

[SH] $\mu\text{mol}/\text{mg}$ collagène modifié = 0,229, soit environ 3,9 résidus cystéiques pour 100 AA de la chaîne de collagène.

Analyse calorimétrique : la température de fusion du gel physique en présence d'une solution tampon pH 7,4, est de 28° C. Ceci montre que la triple hélice a été détruite lors de la modification chimique.

EXEMPLE 3 : MODIFICATION DE GELATINE PAR REACTION AVEC LE DMT (R^1 , $\text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^3 = \text{CH}_3$).

20

On effectue la dissolution de 1,5 g de gélatine dans un mélange de 5 ml d'eau et 30 ml de NMP. On y ajoute 1,5 g d'acide succinique. Après évaporation sous vide de l'eau, on obtient une solution anhydre et transparente à base de gélatine. Parallèlement à cela, on prépare une solution de DMT activé, par réaction de 1,18 g de DMT-COOH avec 1,17 g de CDI dans 10 ml de NMP, pendant 60 minutes à température ambiante. Les deux solutions sont ensuite mélangées ensemble pendant 16 heures. Après l'ajout de 30 ml d'eau à pH 2, la solution est dialysée contre l'eau à pH 2, puis lyophilisée, afin d'obtenir un produit blanc déprotégé (1,5 g).

La teneur en résidus cystéiques est déterminée par réaction avec le DTNB, puis dosage spectrophotométrique.

30

RÉSULTATS :

[SH] $\mu\text{mol}/\text{mg}$ collagène modifié = 0,229, soit environ 2,6 résidus cystéiques pour 100 AA.

5 **EXEMPLE 4 : MODIFICATION DE GELATINE PAR REACTION AVEC DE L'ACIDE CARBOXYLIQUE-4-THIAZOLIDINE ($\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4 = \text{H}$).**

On effectue la dissolution de 1,5 g de gélatine dans un mélange de 5 ml d'eau et 10 ml de NMP. On ajoute à cela 1,5 g d'acide succinique. Après évaporation sous vide de l'eau, on obtient une solution anhydre et transparente à base de gélatine. Parallèlement à cela, on prépare une solution de DMT activée par réaction de 1,0 g de 4-carboxy-thiazolidine (Aldrich) avec 1,17 g de CDI dans 10 ml de pendant 60 minutes à température ambiante. Les deux solutions sont ensuite mélangées ensemble pendant 16 heures. Après l'ajout de 30 ml d'eau à pH 2, la solution est dialysée contre l'eau à pH 2, puis lyophilisée. On récupère enfin un produit blanc déprotégé (1,5 g).

La teneur en résidus cystéiques est déterminée par réaction avec le DTNB, puis dosage spectrophotométrique.

20 **RÉSULTATS :**

[SH] $\mu\text{mol}/\text{mg}$ collagène modifié = 0,19, soit environ 2,3 résidus cystéiques pour 100 AA.

25 **EXEMPLE 5 : OXYDATION DE COLLAGENE TRIPLE HELICE GREFFE PAR DU DMT AVEC L'EAU OXYGENEE.**

Le produit obtenu dans l'exemple 1 est solubilisé en milieu aqueux pH 3 à une concentration de 1 % et on coule la solution dans un moule. On ajoute de l'eau oxygénée pour obtenir une concentration finale de 0,3 % et on laisse reposer pendant 30 24 heures. Le gel mou est ensuite récupéré, lavé à l'eau et stocké dans une enceinte humide.

L'analyse calorimétrique révèle que la température de dénaturation en solution tampon pH 7,4 est de 48° C.

**EXEMPLE 6 : OXYDATION DU COLLAGENE TRIPLE HELICE GREFFE PAR DU DMT
5 AVEC IODE.**

Le produit obtenu dans l'exemple 1 est solubilisé en milieu aqueux pH 3 à une concentration de 1 % et on ajoute une solution d'iode (3 % I₂-KI). On observe la disparition de la couleur caractéristique de l'iode et la formation d'un gel identique à celui obtenu dans l'exemple 2.

**EXEMPLE 7 : FIBRILLOGENÈSE ET OXYDATION DU COLLAGENE TRIPLE HELICE
GREFFE AU DMT.**

15 Le produit obtenu dans l'exemple 1 est solubilisé à + 4° C en milieu aqueux de pH 2 à une concentration de 3,5 g/l pendant 24 heures. La solution ainsi obtenue est maintenue à 4° C. On lui ajoute une quantité de 0,2 M de phosphate de potassium (dibasique) pour atteindre un pH de 7,4. La solution est ensuite chauffée pour atteindre 24°C. Elle est maintenue à 24°C pendant 4 heures. Le milieu est ensuite 20 centrifugé pour récupérer les morceaux d'hydrogel, qui sont lavés au tampon phosphate (pH 7,4) puis recentrifugés. L'analyse calorimétrique révèle que la température de dénaturation en solution tampon pH 7,4 est de 48° C. Les morceaux d'hydrogel sont placés dans une solution tamponnée (phosphate pH 7,4) à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée, pour obtenir une concentration finale de 0,3 %. On laisse 25 ensuite reposer pendant 24 heures. L'hydrogel est récupéré par centrifugation, lavé avec de l'eau tamponnée (phosphate pH 7,4) et recentrifugé. L'analyse calorimétrique révèle que la température de dénaturation est comprise entre 55-80° C.

EXEMPLE 8 : PROPRIETES MECANIQUES DE COLLAGENE-CYSTEINE ET DE GELATINE-CYSTEINEE OXYDES PAR L'EAU OXYGENEE.

- Les produits obtenus dans les exemples 2 et 3 peuvent être solubilisés en milieu aqueux pH 3-10 à une concentration de 10 %. On obtient un gel physique en refroidissant les solutions. Ensuite, on peut démouler l'objet et on le place dans un bain d'eau oxygénée (à 1 %) refroidi à 4°C pendant 24 heures. Les gels réticulés obtenus sont ensuite récupérés du bain, lavés à l'eau et stockés dans une enceinte humide.
- Les modules de dureté de la gélatine et du collagène ont été mesurés avec un appareil à compression utilisant un plongeant de section 12,5 mm² sur une éprouvette de 60 mm de diamètre et 60 mm de profondeur.
Module de compressibilité = 1-6 N/mm.
Compression maximale à la rupture = 3-10 N.

REVENDICATIONS :

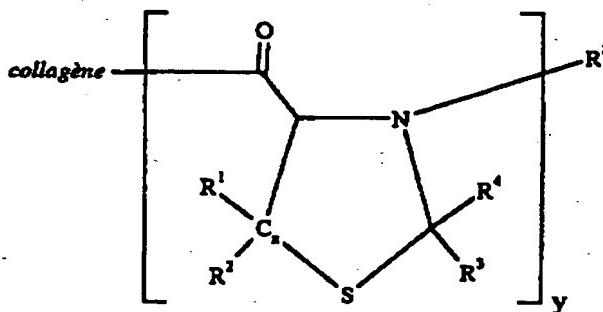
1 - Biopolymère, en particulier collagène, modifié à l'aide de greffons constitués par des résidus de cystéine ou de ses dérivés ("résidus cystéiques") liés à des fonctions réactives dont est porteur ledit biopolymère et comprenant chacun au moins un groupement soufré et au moins un groupement azoté, tous deux protégés par un seul et même groupement protecteur.

2 - Biopolymère, en particulier collagène, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le greffon répond à la formule générale suivante :

10

(I)

15



dans laquelle :

- x est un nombre entier et lorsque ce nombre entier est supérieur à 1, R¹ et R² peuvent être identiques ou différents de carbone à carbone,

- y est un nombre entier,

- R¹, R², R³, R⁴ sont semblables ou différents et représentent l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les alkyles linéaires et/ou cycliques et/ou ramifiés, les aryles, les aralkyles, les alcényles, les aralcényles, les alcynes ou les aralcyne, tous ces radicaux étant éventuellement substitués, et les alkyles inférieurs en C₁-C₆ étant plus particulièrement préférés,

- R⁵ est l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les radicaux acyles, alkyloxycarbonyles, aryloxycarbonyles ou aralkyloxycarbonyles, l'hydrogène étant plus particulièrement préféré.

30

3 - Biopolymère, en particulier collagène, selon la revendication 2, caractérisé en ce que R¹ = R² = H ou CH₃, et R³ = R⁴ = CH₃.

4 - Biopolymère, en particulier collagène, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le greffon (I) est fixé sur le biopolymère dans une concentration inférieure ou égale à 3,0 mmol de (I)/g de collagène.

5 - Biopolymère, en particulier collagène thiolé, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir du biopolymère selon la revendication 1.

6 - Biopolymère, en particulier collagène, réticulé par formation de ponts disulfures, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir du biopolymère selon la revendication 1.

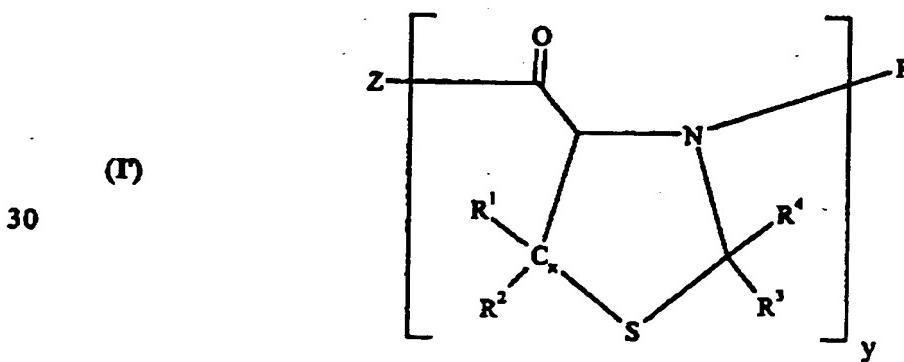
7 - Biopolymère, en particulier collagène thiolé selon la revendication 1
10 caractérisé en ce qu'il se présente sous forme de triples hélices non dénaturées et en ce que ces triples hélices sont organisées et alignées en faisceau de manière à former une structure fibreuse.

8 - Procédé de préparation d'un biopolymère, en particulier de collagène, modifié, caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :

- 15 - à mettre le biopolymère de départ en présence d'un solvant, de préférence organique,
- 20 - à mettre en oeuvre au moins un greffon constitué par au moins un résidu cystéique comprenant au moins un groupement soufré et au moins un groupement azoté, tous deux protégés par un seul et même groupement protecteur,
- à faire réagir le biopolymère solvaté avec le greffon,
- et à récupérer le biopolymère ainsi modifié.

9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le greffon répond à la formule générale (I) suivante :

25



- x est un nombre entier et lorsque ce nombre entier est supérieur à 1, R¹ et R² peuvent être identiques ou différents de carbone à carbone,

- y est un nombre entier,

- R¹, R², R³, R⁴ sont semblables ou différents et représentent l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les alkyles linéaires et/ou cycliques et/ou ramifiés, les aryles, les aralkyles, les alcényles, les aralcényles, les alcynes et les aralcynes, tous ces radicaux étant éventuellement substitués, et les alkyles inférieurs en C₁-C₆ étant plus particulièrement préférés,

- R⁵ est l'hydrogène ou un radical hydrocarboné, de préférence choisi parmi les radicaux acyles, alkyloxycarbonyles, aryloxycarbonyles ou aralkyloxycarbonyles, l'hydrogène étant plus particulièrement préféré,

- Z = H, halogène, OR⁶ avec R⁶ = H alkyle, aryle ou aralkyle, imidazole ou autres résidus minéraux ou organiques, aptes à conférer au greffon une réactivité vis-à-vis des fonctions amines et/ou alcools du biopolymère, afin de former des liaisons covalentes de type ester et/ou amide.

10 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le biopolymère de départ est un collagène natif ou un atélocollagène, dénaturés ou non, ou bien encore un mélange d'au moins deux de ces différents collagènes.

11 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que R¹ = R² = H et R³ = R⁴ = CH₃, dans le greffon (I').

12 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on active le reste carboxylique du greffon (I') avant de le faire réagir avec le biopolymère.

13 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'on récupère le biopolymère modifié par précipitation et/ou élimination du solvant, ladite élimination s'opérant, de préférence, par filtration, par gradient de densité ou par évaporation.

14 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le biopolymère modifié est mis en présence d'un milieu aqueux de déprotection, de façon à obtenir du biopolymère thiolé.

15 - Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on soumet le biopolymère thiolé à une oxydation apte à amener le biopolymère, en particulier

le collagène, à un état au moins partiellement réticulé, par formation de ponts disulfures.

16 - Application du biopolymère, en particulier du collagène, selon la revendication 1, ou de celui obtenu par le procédé selon la revendication 8, dans la fabrication d'articles utilisables en médecine, du type implants, prothèses, peaux artificielles, pansements, revêtements de prothèses, systèmes à libération contrôlée de principe actif, adhésifs ou analogues.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.
PCT/FR 95/01117

^A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C08H1/06 C09H7/00 A61L15/00 A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C08H C09H A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 13731 (FLAMEL TECHNOLOGIES) 23 June 1994 see claims	1,8,16

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 1995

Date of mailing of the international search report

29.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01117

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9413731	23-06-94	FR-A-	2699184	17-06-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la Internationale No
PCT/FR 95/01117

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C08H1/06 C09H7/00 A61L15/00 A61L27/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C08H C09H A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,94 13731 (FLAMEL TECHNOLOGIES) 23 Juin 1994 voir revendications	1,8,16

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *B* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou être utilisé pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 29 Novembre 1995	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 29.12.95
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentam 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tz. 31 651 epo nl Fax (+ 31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Mazet, J-F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De Internationale Na
PCT/FR 95/01117

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9413731	23-06-94	FR-A- 2699184 EP-A- 0674677	17-06-94 04-10-95